

## UJI SITOTOKSISITAS FRAKSI PROTEIN DAUN *CARICA PAPAYA* L. PADA SEL HeLa

### CITOTOXICITY TEST OF THE PROTEIN FRACTIONS OF *CARICA PAPAYA* L. LEAVES ON HeLa CELL LINE.

Rumiyati, Sismindari dan Sudjadi

Bag. Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

#### ABSTRAK

Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa protein mirip RIP dari daun *Carica papaya* L. diketahui terkandung dalam fraksi kejenuhan amonium sulfat 60-80 %. Untuk mengetahui efek toksik dari fraksi – fraksi tersebut, maka pada penelitian ini akan dilakukan uji sitotoksitas pada salah satu sel kanker yakni sel HeLa.

Untuk mendapatkan fraksi protein dari daun *Carica papaya* L. terlebih dahulu dilakukan pengendapan ekstrak gubal dengan amonium sulfat pada kejenuhan 60% dan 80%. Terhadap fraksi pengendapan yang diperoleh, dilakukan uji aktivitas dalam memotong DNA superkoil untuk memastikan adanya RIP. Selanjutnya fraksi protein tersebut diuji efek sitotoksitasnya secara *in vitro* pada sel HeLa

Hasil menunjukkan bahwa fraksi 60% dan 80% bersifat kurang toksik terhadap sel HeLa dengan  $LC_{50}$  berturut-turut 1,35 mg/ml dan 0,936 mg/ml dibandingkan dengan ekstrak gubal dengan  $LC_{50}$  0,623 mg/ml. Tingginya toksitas pada ekstrak gubal mungkin disebabkan oleh adanya komponen selain RIP.

**Kata kunci :** sitotoksitas, fraksi protein, sel HeLa

#### ABSTRACT

Previous research showed that a RIP like protein from *Carica papaya* L. leaves was available on 60 – 80% saturation ammonium sulfate fraction. In this research cytotoxicity assay of the protein fractions was carried out on HeLa cell lines.

RIP-like protein from *Carica papaya* L. leaves, isolated by ammonium sulfate saturation was prepared based on the ability of cleaving double stranded supercoiled DNA. This fraction was then tested its cytotoxicity on HeLa cell lines.

The results indicated that fraction at 60% and 80% saturation possessed lower activity with the  $LC_{50}$  of 1,35 mg/ml and 0,936 mg/ml, respectively compared to the crude extracts ( $LC_{50}$  0,623 mg/ml). The higher toxicity level of the crude extract might be caused also by toxicity of other compounds containing in the crude extract.

**Key word :** cytotoxicity, protein fraction, HeLa cell line

#### PENDAHULUAN

Daun *Carica papaya* L. telah terbukti mengandung protein sejenis RIP (*Ribosome – inactivating protein*) seperti diketahui pada penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa ekstrak gubal daun mempunyai aktivitas memotong DNA superkoil dan aktivitas N-glikosidase (Purnamawati dan Sismindari, 1997; Rumiyati, dkk., 2000). Aktivitas-aktivitas tersebut juga dipunyai oleh beberapa tanaman yang secara tradisional telah digunakan dalam pengobatan kanker seperti misalnya *Annona squamosa* L, *Mirabilis jalapa* L. dan *Morinda citrifolia* L. (Hussaana, 1996; Sismindari dkk., 1998). Adanya aktivitas N-glikosidase dari RIP tersebut menyebabkan sintesis protein pada mamalia terhambat. Oleh karena itu protein dari *Carica papaya* L. mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai antikanker.

RIP telah terbukti juga bersifat toksik terhadap sel dan efek sitotoksitas RIP ini telah diuji menggunakan sel makrofag, trofoblas, *choriocarcinoma-derived BeWo cell line*, sel HeLa, *human embrionic*

*fibroblast*, fibroblas mencit L929 dan *Burkitt's lymphoma-derived cell lines*. Sel-sel tersebut terbukti menunjukkan sensitivitas terhadap RIP yang sangat bervariasi (Barbieri dkk, 1993; Hartley, *et al.*, 1996; Stirpe, *et al.*, 1992).

Pemurnian parsial ekstrak gubal daun *Carica papaya* L. menggunakan ammonium sulfat menunjukkan bahwa RIP diduga terkandung pada fraksi dengan kejenuhan 60 – 80 % seperti ditunjukkan oleh kemampuannya dalam memotong DNA superkoil dan adanya aktivitas N-glikosidase (Rumiyati, dkk., 2000). Untuk selanjutnya perlu diuji kemungkinan efek toksiknya terhadap beberapa sel kanker, diantaranya sel HeLa yang merupakan sel kanker leher rahim manusia.

## METODOLOGI

### Bahan

Daun *Carica papaya* L. varietas jinggo diidentifikasi di Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, diambil dari daerah Godean Yogyakarta.

Kultur Sel HeLa koleksi Lab. Hayati UGM. Bahan-bahan kimia p.a. (Merck)

### Jalan Penelitian

#### Preparasi sampel ekstrak gubal (*Crude Extract*).

Daun yang telah digerus diekstraksi menggunakan dapar fosfat 0,5 mM pH 7,2 yang mengandung 0,14 M NaCl pada suhu 4°C.

#### Preparasi DNA plasmid pUC19

Preparasi DNA pUC19 yang digunakan untuk uji aktivitas DNA superkoil dilakukan dengan metode lisis alkali dengan NaOH SDS 0,2 M kemudian dimurnikan dengan diekstraksi menggunakan fenol-kloroform dan selanjutnya DNA diendapkan dengan etanol absolut (Sambrook dkk., 1989).

#### Pemurnian parsial dengan pengendapan bertingkat dari ekstrak gubal daun menggunakan amonium sulfat.

Ekstrak gubal yang diperoleh, diendapkan secara bertingkat yakni 60% dan 80% dengan amonium sulfat yang sudah dikeringkan dengan jumlah sesuai dengan tabel dalam Scope (1987). Setiap penambahan amonium sulfat diikuti dengan pengadukan secara teratur selama 30 ' pada 4 °C. Kemudian disentrifus pada 28000 g selama 30 menit. Endapan dipisahkan dari supernatan lalu dilarutkan dalam bufer fosfat. Supernatan disisihkan kemudian sisanya diendapkan ke prosentase amonium sulfat berikutnya. Endapan maupun supernatan yang disisihkan didialisis dua kali terhadap bufer natrium fosfat 0,5 mM pH 6,5 pada 4°C. Ekstrak hasil dialisis diukur kadar proteinnya dengan alat spektrofotometri ultraviolet (uv), kemudian disimpan pada -20°C.

#### Menentukan fraksi protein aktif hasil pemurnian parsial.

Fraksi pengendapan 60% dan 80% bersama ekstrak gubal diuji aktivitasnya dalam memotong DNA superkoil (plasmid pUC19) dengan cara menginkubasi sejumlah tertentu fraksi tersebut dengan DNA plasmid pUC19 dalam bufer yang mengandung Tris-HCl 10mM, MgCl 50 mM dan NaCl 100mM pada 30 selama 1 jam. Hasil reaksi kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose 0,8%.

### Uji sitotoksitas fraksi aktif

a. Menumbuhkan sel HeLa dari penyimpanan dalam nitrogen cair.

Sel dimasukkan ke dalam tabung *conical*, lalu dicuci dengan media pencuci sebanyak tiga kali dengan disentrifugasi pada 1500 g selama 10'. Pelet yang diperoleh dimasukkan dalam *flask* kemudian ditambahkan media penumbuh dan diinkubasi pada 37°C dengan aliran CO<sub>2</sub>.

b. Uji sitotoksitas fraksi aktif

Sebanyak 100µl sel yang sedang tumbuh dengan kepadatan sel  $5 \times 10^4$  dimasukkan ke dalam tiap sumuran *Tissue culture cluster*, kemudian diinkubasi selama 4 jam, suhu 37°C dalam aliran CO<sub>2</sub> 5%. Setelah itu ditambahkan ekstrak gubal dan fraksi 60% dan 80% dengan seri kadar tertentu, lalu diinkubasi lagi selama 24 jam, 37°C dalam aliran CO<sub>2</sub> 5%. Pada akhir inkubasi ditambahkan 10 µl MTT (5mg/ml) pada tiap sumuran dan diinkubasi lagi selama 4 jam, 37° C dengan aliran CO<sub>2</sub> 5%. Sebelum tiap sumuran dibaca dengan Elisa reader pada panjang gelombang 550 nm, kultur tadi ditambahkan asam klorida-isopropanol.

### Analisis data

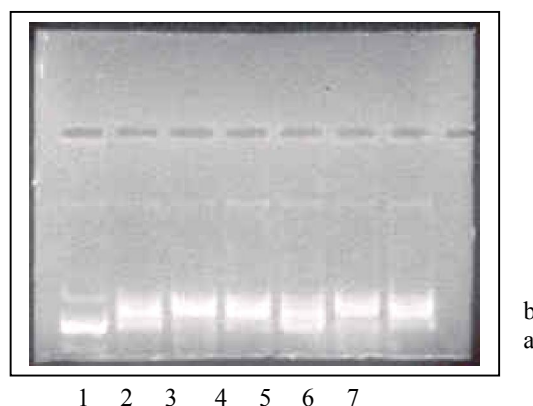
Jumlah sel yang hidup sebanding dengan harga absorbansi. Selanjutnya persentase kematian dapat dihitung dengan mengurangkan absorbansi kontrol positif dengan absorbansi perlakuan kemudian dibagi dengan absorbansi kontrol positif dan mengalikannya dengan 100%. Dari data persentase kematian tersebut dengan menggunakan analisis probit dapat ditentukan harga  $LC_{50}$ -nya untuk mengetahui potensi ketoksikannya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian sebelumnya melalui uji aktivitas pemotongan DNA superkoil dan uji aktivitas N-glikosidase pada rRNA *yeast* telah dapat ditunjukkan bahwa fraksi yang relatif aktif terhadap kedua aktivitas tersebut adalah fraksi pada kejenuhan amonium sulfat 60% dan 80%, sehingga diduga kuat fraksi-fraksi tersebut mengandung RIP (Rumiyati, dkk., 2000). Oleh karena itu, pada penelitian ini fraksinasi dilakukan pada kejenuhan 60% dan 80% yang untuk selanjutnya akan dilakukan uji sitotoksitas dari fraksi tersebut terhadap sel HeLa.

Untuk meyakinkan bahwa fraksi yang diperoleh tersebut mengandung RIP maka baik ekstrak gubal, fraksi 60 % dan 80 % diuji aktivitasnya terhadap kemampuannya dalam memotong DNA superkoil. Hasil menunjukkan bahwa ketiga-tiganya mempunyai aktivitas memotong DNA superkoil menjadi nick sirkuler dan linier (Gambar 1). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ekstrak gubal, fraksi 60% dan 80% mengandung RIP. Aktivitas yang relatif lebih tinggi terjadi pada fraksi pengendapan 60% baik pada kadar protein 1,5 mg/ml maupun 2 mg/ml (lajur 3 dan 6), apabila dibandingkan dengan fraksi 80 % (lajur 4 dan 8) dan ekstrak gubal (lajur 2 dan 5). Hal ini ditunjukkan oleh ketebalan pita DNA linier yang terbentuk yang dalam gambar 1 tidak terpisah dengan baik dengan pita DNA nick sirkuler. Tingginya aktivitas juga ditandai oleh menipisnya DNA bentuk superkoil.

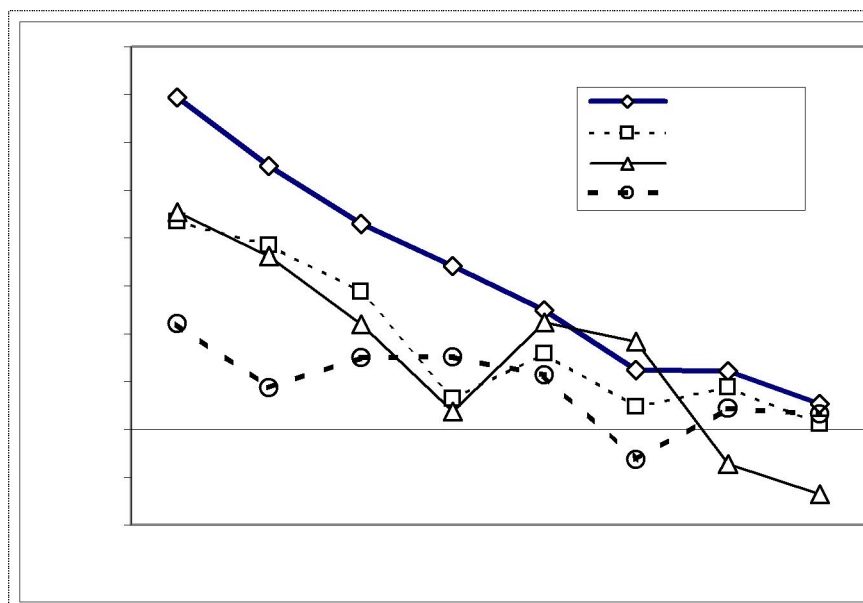
Hasil aktivitas pada penelitian ini berbeda dengan hasil yang diperoleh sebelumnya yang menunjukkan bahwa aktivitas pemotongan DNA superkoil yang paling tinggi adalah fraksi pada kejenuhan 80 % yang kemudian diikuti dengan fraksi 60 % dan ekstrak gubal (Rumiyati, dkk., 2000). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya perbedaan perlakuan dalam proses pengendapan dengan amonium sulfat.



Gambar 1. Pemotongan DNA superkoil oleh fraksi 60% dan 80 %.(1) DNA superkoil utuh (kontrol negatif), (2) 1,5 mg/ml protein ekstrak gubal,(3) protein 1,5 mg/ml protein fraksi pengendapan 60 %, (4) 1,5 mg/ml protein fraksi pengendapan 80 %, (5) mg/ml protein ekstrak gubal (6) 2 mg/ml protein fraksi pengendapan 60 %, (8) 2 mg/ml protein fraksi pengendapan 80 %. Kekuatan aktivitas tiap fraksi pengendapan ditunjukkan dengan semakin tipisnya pita DNA superkoil (a), ketebalan pita DNA linier (b).

Hasil uji sitotoksitas (Gambar 2) menunjukkan bahwa pada kadar protein tertinggi, yakni 1,25 mg/ml, ekstrak gubal mempunyai persentase kematian tertinggi, kemudian diikuti oleh fraksi 80%, fraksi 60% baru blanko ( bufer natrium sulfat). Dengan menurunnya kadar protein yang diberikan pada sel HeLa persentase kematian antar perlakuan juga semakin menurun. Akan tetapi, ada beberapa titik yang menyimpang, seperti pada seri kadar protein 0,16 mg/ml pada fraksi 60 % dan 80% memberikan persen kematian yang lebih rendah dibandingkan dengan seri kadar 0,08%. Bahkan pada seri kadar 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml dari fraksi 80% memberikan persentase kematian dibawah nol. Adanya penyimpangan ini mungkin disebabkan kesalahan kerja antara lain proses dilusi antar perlakuan yang tidak sama atau kurang homogenya pencampuran suspensi sel dengan fraksi protein.

Dari harga  $LC_{50}$ , yaitu kadar yang menyebabkan kematian sel HeLa sebesar 50% yang dihitung dengan menggunakan analisis probit, menunjukkan bahwa ekstrak gubal, fraksi 60% dan 80% berturut-turut mempunyai harga 0,623 mg/ml, 1,35 mg/ml, dan 0,936 mg/ml. Telah diketahui bahwa semakin kecil harga  $LC_{50}$ , suatu senyawa akan semakin bersifat toksik terhadap sel. Oleh karena itu dari data ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak gubal bersifat lebih toksik terhadap sel HeLa daripada fraksi 60% dan 80%. Hasil uji sitotoksik ini berlawanan dengan hasil uji pemotongan DNA superkoil yakni fraksi 60 % mempunyai aktivitas yang paling tinggi daripada ekstrak gubal. Perbedaan tingkat aktivitas tersebut kemungkinan pertama disebabkan karena di dalam ekstrak gubal mengandung senyawa lain di samping RIP yang juga mempunyai efek toksik terhadap sel HeLa, sehingga ekstrak gubal lebih toksik dibandingkan dengan fraksi 60%. Kedua bahwa aktivitas memotong DNA superkoil merupakan aktivitas yang spesifik untuk RIP, sehingga fraksi 60% mempunyai aktivitas memotong DNA superkoil yang relatif paling tinggi.

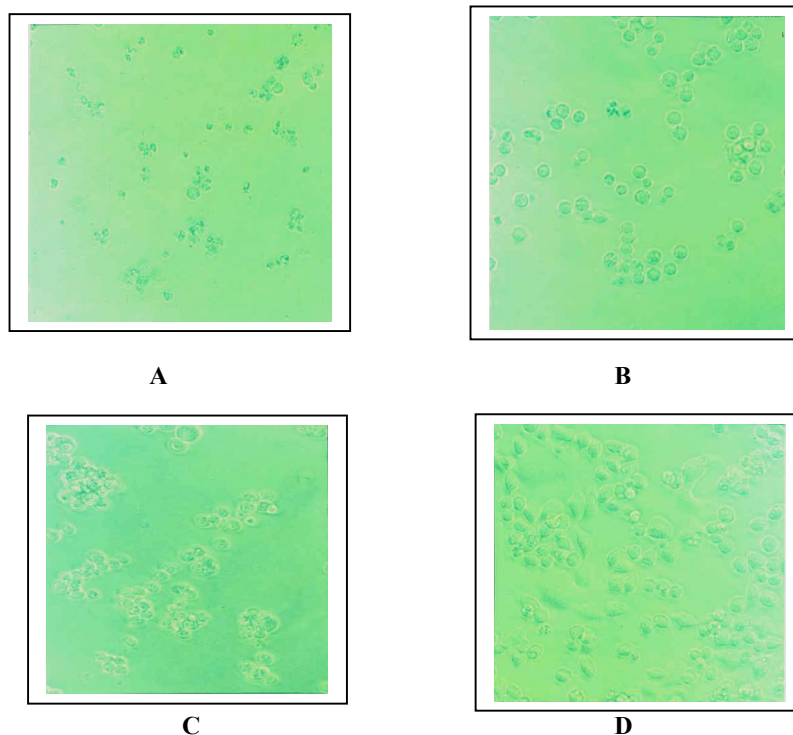


Gambar 2. Kurva uji sitotoksitas fraksi protein daun *Carica papaya* L pada Sel HeLa

Adanya perbedaan tingkat toksisitas ekstrak gubal, fraksi 60% dan 80% didukung oleh data morfologi sel HeLa yaitu pengamatan sebelum ditambahkan MTT dengan melakukan pengambilan gambar sel seperti pada gambar 3. Terlihat bahwa jumlah sel yang mati pada perlakuan protein kadar 1,25 mg/ml dari ekstrak gubal (A) lebih banyak daripada perlakuan dengan fraksi 60% (B), fraksi 80% (C) dan kontrol tanpa perlakuan (D). Kematian sel tersebut ditandai oleh keruh atau mengapungnya sel di dalam media.

Toksitas ekstrak gubal, fraksi 60% dan 80 % dari daun *Carica papaya* L. ini masih dibawah toksitas ekstrak tanaman lain yang mengandung protein sejenis RIP. Perbedaan toksitas ini ditunjukkan

oleh peneliti lain yang menunjukkan bahwa ekstrak gubal akar *Mirabilis yalapa* L. mempunyai harga  $LC_{50}$  0,091 mg/ml (Ikawati, dkk., 2002).



Gambar V.2. Hasil uji sitotoksitas fraksi protein daun *Carica papaya* L. pada sel HeLa dengan waktu inkubasi 48 jam sebelum pemberian MTT (perbesaran 150 x). (A) Perlakuan ekstrak gubal dengan kadar protein 1,25 mg/ml, (B) Perlakuan fraksi 60% dengan kadar protein 1,25 mg/ml, (C) Perlakuan fraksi 80% dengan kadar protein 1,25 mg/ml, (D) Kontrol atau tanpa perlakuan (i) sel yang hidup menempel pada dasar sumuran (ii) sel yang mati tampak keruh dan mengapung.

## KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa fraksi protein 60% dan 80% kejenuhan amonium sulfat dari daun *Carica papaya* L. bersifat kurang toksik terhadap sel HeLa ( $LC_{50}$  1,35 mg/ml , 0,936 mg/ml) dibandingkan dengan ekstrak gubal ( $LC_{50}$  0,623 mg/ml.)

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada P2IPT-DIKTI th. Anggaran 2002 dengan no. kontrak : 022 /P2IPT/DPPM/IV/2002 tanggal 9 April 2002 yang telah membiayai penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Barbieri, L., Battelli, M.G., Stirpe, F., 1993, Ribosome-inactivating proteins from Plants, *Biochem. Et Biophys. Acta.*, 1154, 237-282.
- Hartley, M.R., Chaddock, J.A., and Bonness, M.S., 1996, The Structure and Fungtion of Ribosome-inactivatng proteins, *Trends in Plant Science Reviews*, 1 , 254-258.

- Hussaana, A., 1996, Identifikasi Ribosome-inactivating protein (RIP) dari Ekstrak Awal Biji Annona squamosa L. dan Uji Aktivitas Sitotoksiknya terhadap Sel Fibroblas L-929, *Tesis*, Program Studi Ilmu Farmasi, Universitas Gadjah Mada Jogjakarta.
- Ikawati, Z., Sudjadi, Sismindari, Permanasari, R., dan Maulani, N., 2002, Efek Fraksi Protein Sejenis RIP yang Diisolasi dari Akar Mirabilis yalapa L. terhadap Proses Kematian Kultur Sel Hela dan Raji, *Biologi*, 2(13): 769 – 783
- Purnamawati, D. dan Sismindari., 1997, Identifikasi Ribosome-inactivating protein dari Tanaman Carica papaya L. dengan Metode Pemotongan DNA Superkoil, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta.
- Rumiyati, Sismindari dan Sudjadi, 2000, Aktivitas N-glikosidase Fraksi Protein Aktif daun Carica papaya L. pada rRNA yeast, *Majalah Farmasi Indonesia*
- Scope, R. K., 1987, *Protein Purification, Principles and Practice*, Edisi 2, Springer Verlag, New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 nd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Stirpe, F., Barbieri, L., Batteli, M.G., Soria, M., and Lappi, P.A., 1992, Ribosome-inactivating proteins from Plants: Present Status and Future Prospects, *Biotechnology*, 10, 406-412.
- Sismindari, Husaana, A., and Mubarika, S., 1998, In-vitro Cleavage of Supercoiled Double Stranded DNA by Crude Extract of Annona squamosa, *Indonesian Journal of Pharmacy*, 9, 4, 146-152
- Sismindari and Lord, J.M., 2000, RNA-N-glycosidase Activity of Leaves Crude Extract from Carica papaya L., Morinda citrifolia L., Mirabilis yalapa L., *J. Biotechnology*; Spesial Issue, 342-345